

No title available.

Patent Number: DE19852835
Publication date: 2000-05-18
Inventor(s): HOTZ GERHARD (DE); KOEHLER HEINER (DE); SCHIMKAT DIETER (DE);
LEISTNER HERRMAN (DE)
Applicant(s): STRATEC BIOMEDICAL SYSTEMS AG (DE)
Requested Patent: ☐ DE19852835
Application Number: DE19981052835 19981117
Priority Number (s): DE19981052835 19981117
IPC Classification: B01L3/00 ; G01N1/28 ; G01N35/02 ; G01N33/50
EC Classification: B01L3/00C6C
Equivalents: ☐ WO0029109

Abstract

The invention relates to a sample holder used for carrying out serial analysis of liquid samples and comprising a substrate part (10) having a plurality of recesses (22) for receiving liquid samples and optionally reagents. The aim of the invention is to optimise process and measuring conduct. For that purpose, the recesses are placed at an angular distance from each other in an annular area (20) of said substrate part (10) and are in the form of measuring chambers (22). In addition, a distribution chamber (18) which can be fed with liquid samples is concentrically placed with the annular area (20) within a central area (16) of the substrate part (10). Said distribution chamber (18) is in communication with the measuring chambers (22) through a respective connecting channel (26).

Data supplied from the esp@cenet database - I2



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenl gungsschrift**
⑩ **DE 198 52 835 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 N 35/02
// G01N 33/50

⑦1 Aktenzeichen: 198 52 835.3
⑦2 Anmeldetag: 17. 11. 1998
⑦3 Offenlegungstag: 18. 5. 2000

DE 198 52 835 A 1

⑦1 Anmelder:
STRATEC Biomedical Systems AG, 75217
Birkenfeld, DE

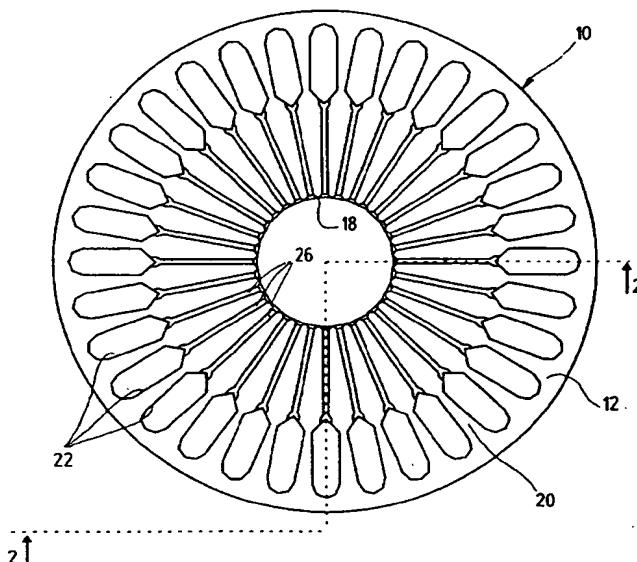
⑦4 Vertreter:
Wolf & Lutz, 70193 Stuttgart

⑦2 Erfinder:
Leistner, Herrman, 75217 Birkenfeld, DE; Hotz,
Gerhard, 73773 Aichwald, DE; Schimkat, Dieter, Dr.,
76275 Ettlingen, DE; Köhler, Heiner, 75217
Birkenfeld, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Probenträger

⑤7 Die Erfindung betrifft einen Probenträger zur Durchführung von Reihenanalysen mit einem eine Vielzahl von Kavitäten (22) zur Aufnahme von Flüssigproben und gegebenenfalls Reagenzien aufweisenden Substratteil (10). Um einen optimierten Prozeß- und Meßablauf zu ermöglichen, wird vorgeschlagen, daß die Kavitäten als Meßkammern (22) in einer Ringzone (20) des Substratteils (10) im Winkelabstand voneinander angeordnet sind, daß in einem Zentralbereich (16) des Substratteils (10) eine mit einer Flüssigprobe beaufschlagbare Aufgabekammer (18) konzentrisch mit der Ringzone (20) angeordnet ist, und daß die Aufgabekammer (18) mit den Meßkammern (22) über jeweils einen Verbindungskanal (26) kommuniziert.



DE 198 52 835 A 1

Die Erfindung betrifft einen Proben-träger zur Durchführung von Reihenanalysen an Flüssigproben mit einem Substratteil, das eine Vielzahl von Kavitäten zur Aufnahme von Flüssigproben und gegebenenfalls Reagenzien aufweist.

In der immunologischen Diagnostik, Genanalyse, Mikrobiologie, Umweltanalytik, klinischen Chemie und weiteren Bereichen ist es häufig erforderlich, eine Vielzahl von Probenanalysen automatisch durchzuführen, wobei vor allem optische Meßverfahren wie Photometrie oder auch Lumino-metrie zum Einsatz kommen. Zu diesem Zweck ist es bekannt, sogenannte Mikrotiter- bzw. Mikrottestplatten als Proben-träger einzusetzen, bei denen in matrixartig angeordneten Kavitäten bzw. Nöpfchen eine Vielzahl von Proben vorgelegt werden können. Dabei ist es in der Regel erforderlich, die einzelnen Kavitäten sequentiell mittels einer Positionier-vorrichtung bezüglich einer Meß- oder Verarbeitungsstation auszurichten. Alternativ wurden bereits Geräte entwickelt, die durch eine Vielzahl von Zugabe- und Meßstationen eine Parallelverarbeitung ermöglichen. Der apparative Aufwand hierfür ist jedoch beträchtlich, insbesondere wenn eine einheitliche Probenverarbeitung sichergestellt sein soll. Außerdem sind einer gewünschten Miniaturisierung durch die dann erschwerte Handhabung der Mikrotiterplatten Grenzen gesetzt.

Ausgehen hiervon liegt der Erfindung die Aufgabe zu-grunde, einen Proben-träger der eingangs genannten Art da-hingehend zu entwickeln, daß ein zeitlich und räumlich opti-mierter Prozeß- und Meßablauf mit der Möglichkeit zur vereinfachten Automatisierung gewährleistet ist. Weiter soll insbesondere zur Verarbeitung kleiner Probenmengen eine weitgehende Miniaturisierung ermöglicht werden.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird die im Patentanspruch 1 angegebene Merkmalskombination vorgeschlagen. Vorteil-hafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Erfindung geht von dem Gedanken aus, eine Flüssig-keit aus einer zentralen Aufgabekammer simultan in eine Vielzahl von radial umgebenden Meßkammern bzw. Reakti- onskammern zu verteilen. Dementsprechend wird nach der Erfindung vorgeschlagen, daß die Kavitäten als Meßkam- mern in einer Ringzone des Substratteils im Winkelabstand voneinander angeordnet sind, daß in einem Zentralbereich des Substratteils eine mit einer Flüssigprobe beaufschlag- bare Aufgabekammer konzentrisch mit der Ringzone ange- ordnet ist, und daß die Aufgabekammer mit den Meßkam- mern über jeweils einen Verbindungskanal kommuniziert. Damit läßt sich eine Testflüssigkeit auf einfache Weise in viele Meßkammern eindosieren. Durch die ringförmige Meßkammeranordnung wird ein paralleler Prozeßablauf er- möglicht. Zugleich wird die Positionierung bezüglich einer Verarbeitungsstelle auch bei miniaturisierter Ausbildung aufgrund einer möglichen Drehbewegung vereinfacht.

In baulich vorteilhafter Ausgestaltung ist es vorgesehen, daß das Substratteil durch eine kreiszylindrische Substrat- scheibe gebildet ist, daß die Aufgabekammer und die Meß- kammer koaxial zu der Zentralachse der Substratscheibe angeordnet sind, und daß die Verbindungskanäle in der Sub- stratscheibe sich radial erstrecken. Dabei ist es weiter gün- stig, wenn die Meßkammern bezüglich der Zentralachse der Substratscheibe symmetrisch verteilt angeordnet sind.

Vorteilhafterweise ist die Aufgabekammer durch eine als zylindrisches Sackloch ausgebildete Zentralausnehmung des Substratteils gebildet. Dabei sollte zur vollständigen Be- füllung der Meßkammern sichergestellt sein, daß das Volu- men der Aufgabekammer größer oder gleich dem Gesamt- volumen der Meßkammern ist.

In herstellungstechnischer Hinsicht ist es von Vorteil, wenn die Aufgabekammer, die Verbindungskanäle und die Meßkammern als Ausnehmungen an einer Planarfläche des Substratteils randoffen sind, und wenn zumindest die Ver- bindungskanäle und die Meßkammern durch ein mit dem Substratteil fest verbundenes Abdeckelement an der Planar- fläche flüssigkeitsdicht abgedeckt sind. Dies kann dadurch erfolgen, daß das Abdeckelement durch ein Flachmaterial gebildet ist, welches im Bereich der Aufgabekammer eine Durchstechnmembran zur Probeninjektion bildet. Alternativ ist es vorteilhaft, das Abdeckelement durch eine Deckel- platte gebildet ist, welche im Bereich der Aufgabekammer einen vorzugsweise sich zu der Öffnung der Aufgabekam- mer hin erweiternden Durchbruch zur Probenaufgabe auf- weist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung weist das Substratteil zur Rotation um seine Zen- tralachse eine formschlüssig mit einem Drchantrieb ver- bindbare Eingriffspartie auf. Damit läßt sich die Probenflüs- sigkeit unter Fliehkrafteinwirkung dosiert verteilen, und die Meßkammern können auf einfache Weise mit nur einem Freiheitsgrad positioniert werden. Eine vorteilhafte Ausführ- ung sieht vor, daß die Eingriffspartie durch einen umfangs- seitig gezahnten Zahnringbereich oder axialen Zahnradfort- satz des Substratteils gebildet ist. Alternativ kommt es auch in Betracht, daß die Eingriffspartie durch eine für den Ein- griff eines Drehmitnehmers ausgebildete Ausnehmung ge- bildet ist.

Ein selbsttätiger Transport der Probenflüssigkeit unter Kapillarwirkung kann dadurch erreicht werden, daß die Ver- bindungskanäle als Kapillarröhren ausgebildet sind. Für eine optimale Probenverteilung in den Meßkammern ist es günstig, wenn die Verbindungskanäle eine sich zu der Meß- kammer hin erweiternde, vorzugsweise in deren oberen Be- reich mündende Mündungsöffnung aufweisen.

Um komplexere Reaktionsabläufe steuern zu können, wird vorgeschlagen, daß die Meßkammern über einen Zu- satzkanal mit jeweils einer zugeordneten Zusatzkammer verbunden sind. In diesem Zusammenhang ist es weiter gün- stig, wenn die Deckelplatte an ihrer von dem Substratteil ab- gewandten Breitseite eine gegebenenfalls sektorweise abge- trennte Ringausnehmung aufweist, welche über jeweils ei- nen Axialdurchbruch in die Zusatzkammern mündet.

Eine steuerbarer Durchfluß durch die Meßkammern kann dadurch ermöglicht werden, daß die Meßkammern jeweils einen vorzugsweise siphonartig ausgebildeten, an einer Mantelfläche des Substratteils mündenden Auslaßkanal auf- weisen.

Vorteilhafterweise besteht das Substratteil als Formteil aus Kunststoff, Glas oder einem Halbleitermaterial.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der in der Zeich- nung in schematischer Weise dargestellten Ausführungsbei- spiele näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 einen scheibenförmigen Proben-träger zur Durch- führung von Reihenanalysen in einer ersten Ausführungs- form bei abgenommenem Abdeckteil in axialer Draufsicht;

Fig. 2 eine teilweise geschnittene Seitenansicht des ge- schlossenen Proben-trägers entsprechend der Linie 2-2 der Fig. 1;

Fig. 3 ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Proben-trä- gers mit teilweise abgebrochen dargestellter Abdeckplatte in der Draufsicht;

Fig. 4 einen Axialschnitt des Proben-trägers entlang der Schnittlinie 4-4 der Fig. 3;

Fig. 5 und Fig. 6 den mit einem Zahnradfortsatz ausgc- statteten Proben-träger nach Fig. 3 in einer Seitenansicht und einer Stirnseitenansicht von unten;

Fig. 7 ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Proben-trä-

gers in einer ausschnittsweisen Draufsicht bei abgenommenem Abdeckteil; und

Fig. 8 eine Ausführungsform eines Probenrähers mit einer für den Eingriff eines Drehmitnehmers ausgebildeten Ausnehmung entsprechend der Darstellung nach Fig. 6.

Die in der Zeichnung dargestellten Probenrähers sind durch ein scheibenförmiges Formteil bzw. Substratteil 10 gebildet, das an seiner planaren Oberseite 12 fest mit einem Abdeckelement 14, 14' verbunden oder verbindbar ist. Das Substratteil 10 ist in einem axialen Zentralbereich 16 mit einer Aufgabekammer bzw. Zentralausnehmung 18 versehen, die als zylindrisches Sackloch über eine Aufgabeeöffnung an der Oberseite 12 des Substratteils mit einer Flüssigprobe beaufschlagbar ist. Weiterhin weist das Substratteil 10 in einer peripheren Ringzone 20 eine Vielzahl von Kavitäten bzw. Meßkammern 22 auf, die in gleichem Winkelabstand voneinander bezüglich seiner Zentralachse 24 symmetrisch verteilt angeordnet sind. Die Meßkammern 22 weisen einen in radialer Richtung oval-langgestreckten lichten Querschnitt auf und sind als Ausnehmungen an der Substratteil-Oberseite 12 randoffen. Zur Verteilung der Flüssigprobe ist die Aufgabekammer 18 mit den Meßkammern 22 über jeweils einen Verbindungskanal 26 verbunden. Die Verbindungskanäle 26 verlaufen als Vertiefungen an der Oberseite 12 des Substratteils 10 ausgehend von der Aufgabekammer 18 geradlinig in radialer Richtung und weisen eine zu der jeweiligen Meßkammer 22 hin sich erweiternde Mündungsöffnung 28 auf.

Die vorstehend beschriebenen Merkmale sind bei allen in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen verwirklicht, wobei funktionsgleiche Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Bei der Ausführungsform nach Fig. 2 ist das Abdeckelement 14 zur flüssigkeitsdichten Abdeckung der Aufgabekammer 18 sowie der Meßkammern 22 und Verbindungskanäle 26 durch ein Flachmaterial bzw. Folienmaterial 30 gebildet, welches stoffschlüssig flächig mit der Oberseite 12 des Substratteils 10 verbunden ist und im Öffnungsbereich der Aufgabekammer 18 eine Durchstechmembran zur Injektion einer Flüssigprobe bildet.

Bei der in Fig. 3 und 4 gezeigten Ausführungsform sind die Meßkammern 22 über jeweils einen Zusatzkanal 32 mit einer zugeordneten Zusatzkammer 34 verbunden. Die Zusatzkammern 34 sind in raumsparender Weise zwischen den Verbindungskanälen 26 angeordnet. Sie ermöglichen einerseits die Aufnahme bzw. Durchleitung der beim Flüssigkeitseintritt aus den Meßkammern 22 verdrängten Luft und erlauben andererseits eine zusätzliche Beaufschlagung der Meßkammern 22 beispielsweise mit einer Waschflüssigkeit in der nachstehend beschriebenen Weise.

Zum Verschluß der Ausnehmungen 22, 26, 32, 34 ist eine scheibenförmige Deckelplatte 14' als Abdeckelement vorgesehen. Diese weist einen zu der Öffnung der Aufgabekammer 18 hin sich konisch erweiternden Durchbruch 36 zur Probenaufgabe auf. Weiterhin ist die Deckelplatte 14' an ihrer von dem Substratteil 10 abgewandten Breitseite 38 mit einer Ringausnehmung 40 versehen, welche über jeweils einen Axialdurchbruch 42 in eine darunterliegende Zusatzkammer 34 mündet. Auf diese Weise kann eine Flüssigkeit durch Beaufschlagung der Ringausnehmung 40 in die Zusatzkammern 34 und von dort in die Meßkammern 22 verteilt werden. Grundsätzlich ist es auch möglich, daß die Ringausnehmung 40 zur getrennten Flüssigkeitsverteilung sektorweise abgetrennt ist.

Zum selbsttätigen Transport der Flüssigprobe bzw. von Testflüssigkeiten kann es vorgesehen sein, daß die Verbindungskanäle 26 und gegebenenfalls die Zusatzkanäle 32 als Kapillarrohren ausgebildet sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß das Substratteil 10 zur Rotation um seine

Zentralachse 24 eine formschlüssig mit einem nicht gezeigten Drehantrieb verbindbare Eingriffspartie aufweist. Auf diese Weise kann eine Flüssigkeit aus der Aufgabekammer 14 unter Fliehkrafteinwirkung, welche über die Drehzahl einstellbar ist, definiert in die Meßkammern 22 gefördert werden. Wie in Fig. 5 und 6 gezeigt, kann die Eingriffspartie durch einen umfangsseitig gezahnten axialen Zahnradfortsatz 44 des Substratteils 10 gebildet sein. Der Fortsatz 44 kann zugleich dazu dienen, einen bodenseitigen Abschnitt der Aufgabekammer 18 aufzunehmen (Fig. 4). Bei der in Fig. 8 gezeigten Ausführungsform weist das Substratteil 10 anstelle eines Zahnradfortsatzes einen axial abgestuften Bodenabschnitt 46 auf, welcher mit einer Querausnehmung 48 für den Eingriff eines nicht gezeigten Drehmitnehmers versehen ist.

Zur Durchleitung von Flüssigkeiten durch die Meßkammern 22 können diese mit einem Auslaßkanal 50 verbunden sein, welcher an der Mantelfläche 52 des Substratteils 10 mündet. Der Auslaßkanal 50 kann dabei siphonartig bzw. S-förmig ausgebildet sein, um so einen Flüssigkeitsdurchlaß erst bei Überschreiten einer gewissen Fliehkraft zu erlauben. Grundsätzlich ist es auch möglich, die Substratscheibe 10 mit einem Strichcode zur Probenkennzeichnung zu versehen, welcher bei einer Drehung des Substratteils 10 einfach abtastbar ist.

Zur Herstellung des Substratteils 10 und der Abdeckplatte 14' ist es zweckmäßig, wenn diese als einstückige Formteile, insbesondere Spritzgußformteile aus Kunststoff ausgebildet sind. Für optische Messungen kann ein transparentes Material mit den gewünschten optischen Eigenschaften verwendet werden, wobei auch Glas bzw. Quarz in Frage kommt. Grundsätzlich ist es auch möglich, die Meßkammern 22 und Zusatzkammern 34 an ihren Wandungen mit Reagenzien zu beschichten oder dort Meßelemente anzubringen. Die Meßkammern können beispielsweise ein Volumen von weniger als 100 Mikrolitern aufweisen, wobei zur ausreichenden Befüllung sichergestellt sein sollte, daß das Volumen der Aufgabekammer größer oder gleich dem Gesamtvolumen der Meßkammern ist. Eine weitere vorteilhafte Variante kann darin bestehen, daß den Meßkammern eine oder mehrere Vorkammern für einen stufenweisen Reaktionsablauf vorgeordnet sind. Zur weiteren Miniaturisierung ist es auch denkbar, das Substratteil als eine Art von Miniaturlabor durch Ätzen einer Halbleiterstruktur zu fertigen.

Patentansprüche

1. Probenrähers zur Durchführung von Reihenanalysen mit einem eine Vielzahl von Kavitäten (22) zur Aufnahme von Flüssigproben und gegebenenfalls Reagenzien aufweisenden Substratteil (10), **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kavitäten als Meßkammern (22) in einer Ringzone (20) des Substratteils (10) im Winkelabstand voneinander angeordnet sind, daß in einem Zentralbereich (16) des Substratteils (10) eine mit einer Flüssigprobe beaufschlagbare Aufgabekammer (18) konzentrisch mit der Ringzone (20) angeordnet ist, und daß die Aufgabekammer (18) mit den Meßkammern (22) über jeweils einen Verbindungskanal (26) kommuniziert.
2. Probenrähers nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratteil durch eine kreiszylindrische Substratscheibe (10) gebildet ist, daß die Aufgabekammer (18) und die Meßkammern (22) koaxial zu der Zentralachse (24) der Substratscheibe angeordnet sind, und daß die Verbindungskanäle (26) in der Substratscheibe sich radial erstrecken.
3. Probenrähers nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, daß die Meßkammern (22) bezüglich der Zentralachse (24) der Substratscheibe (10) symmetrisch verteilt angeordnet sind.

4. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufgabekammer durch eine als zylindrisches Sackloch ausgebildete Zentral-
5 ausnehmung (18) des Substrateils (10) gebildet ist.

5. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumen der Aufgabekammer (18) größer oder gleich dem Gesamtvolumen
10 der Meßkammern (22) ist.

6. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufgabekammer (18), die Verbindungskanäle (26) und die Meßkammern (22) als Ausnehmungen an einer Planarfläche (12) des Sub-
15 strateils (10) randoffen sind, und daß zumindest die Verbindungskanäle (26) und die Meßkammern (22) durch ein mit dem Substrateil (10) fest verbundenes oder verbindbares Abdeckelement (14, 14') an der Planarfläche flüssigkeitsdicht abgedeckt sind.
20

7. Probenräger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Abdeckelement durch ein Flachmaterial (14) gebildet ist, welches im Bereich der Aufgabekammer (18) eine Durchstechmembran zur Probenin-
25 jektion bildet.

8. Probenräger nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Abdeckelement durch eine Deckelplatte (14') gebildet ist, welche im Bereich der Aufgabekammer (18) einen vorzugsweise sich zu der Öffnung der Aufgabekammer (18) hin erweiternden
30 Durchbruch (36) zur Probenaufgabe aufweist.

9. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrateil (10) zur Rotation um seine Zentralachse (24) eine formschlüssig mit einem Drehantrieb verbindbare Eingriffspartie
35 (44, 48) aufweist.

10. Probenräger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Eingriffspartie durch einen umfangsseitig gezahnten Zahnringbereich oder axialen Zahnradfortsatz (44) des Substrateils (10) gebildet ist.
40

11. Probenräger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Eingriffspartie durch eine für den Eingriff eines Drehmitnehmers ausgebildete Ausnehmung (48) gebildet ist.

12. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungskanäle (26) zum Transport der Flüssigprobe unter Kapillarwirkung als Kapillarröhren ausgebildet sind.
45

13. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungskanäle (26) eine sich zu der jeweiligen Meßkammer (22) hin erweiternde, vorzugsweise in deren oberen Bereich mündende Mündungsöffnung (28) aufweisen.
50

14. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßkammern (22) über einen Zusatzkanal (32) mit jeweils einer zugeordneten Zusatzkammer (34) verbunden sind.
55

15. Probenräger nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Deckelplatte (14') an ihrer von dem Substrateil (10) abgewandten Breitseite (38) eine gegebenenfalls sektorweise abgetrennte Ringausnehmung (40) aufweist, welche über jeweils einen Axialdurchbruch (42) in die Zusatzkammern (34) mündet.
60

16. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßkammern (22) jeweils einen vorzugsweise siphonartig ausgebildeten, an einer Mantelfläche des Substrateils (10) mündenden
65

Auslaßkanal (50) aufweisen.

17. Probenräger nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrateil (10) als Formteil aus Kunststoff, Glas oder einem Halbleitermaterial besteht.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

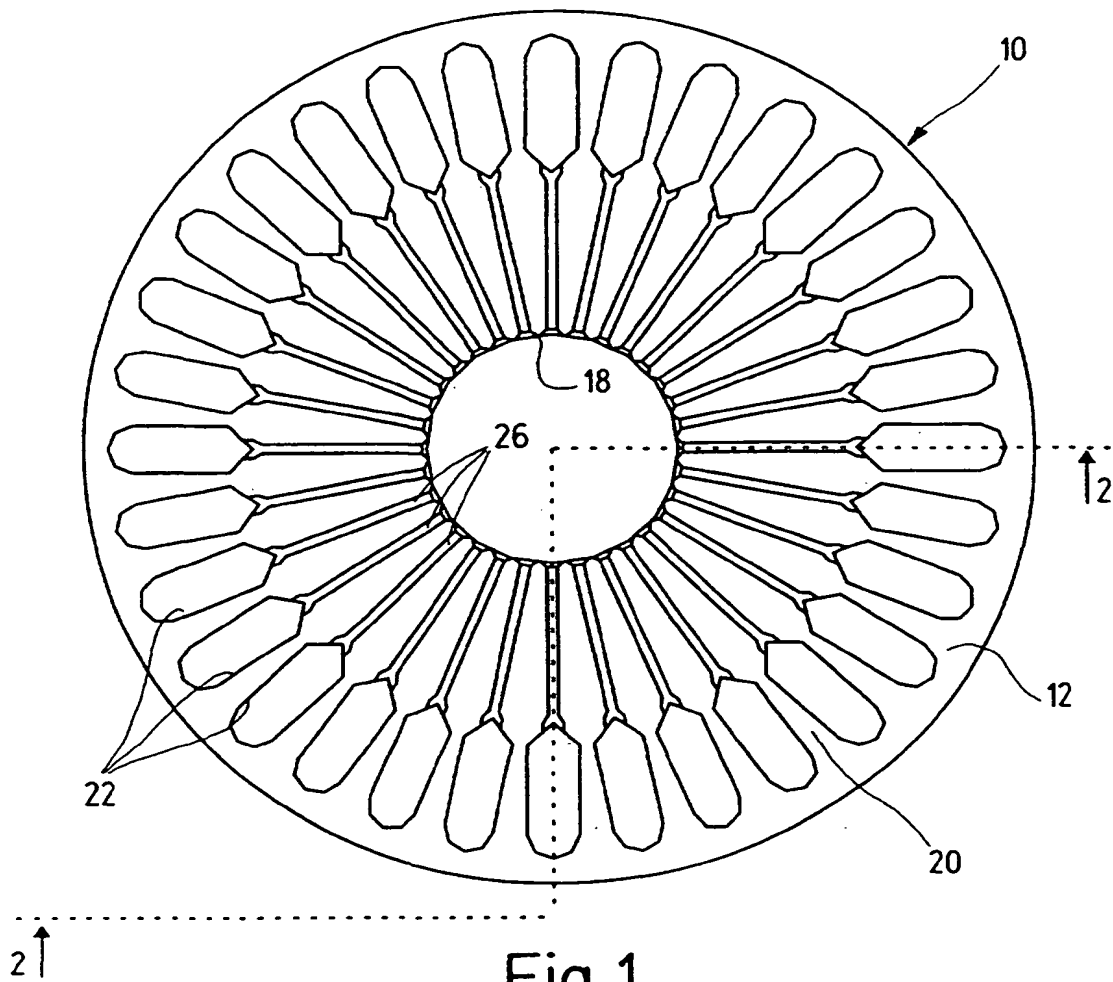


Fig. 1

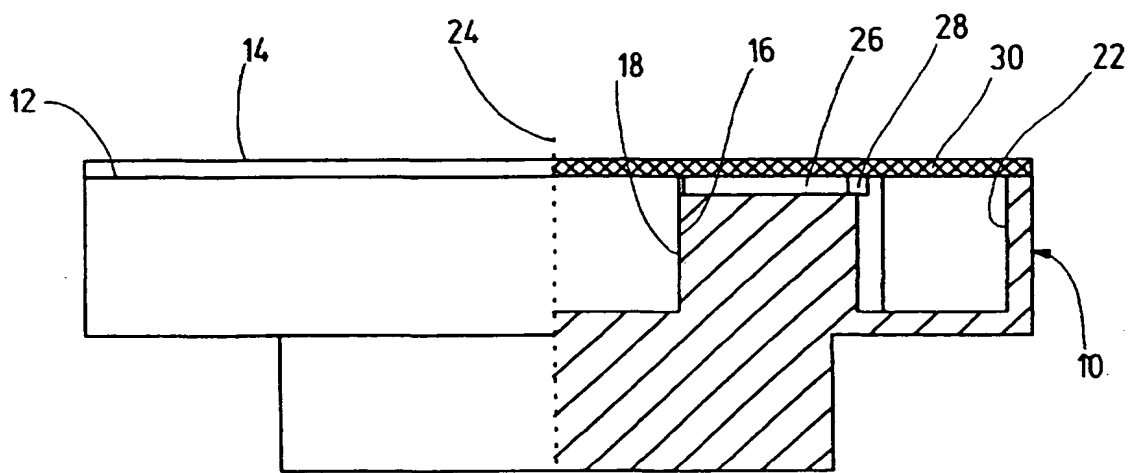


Fig. 2

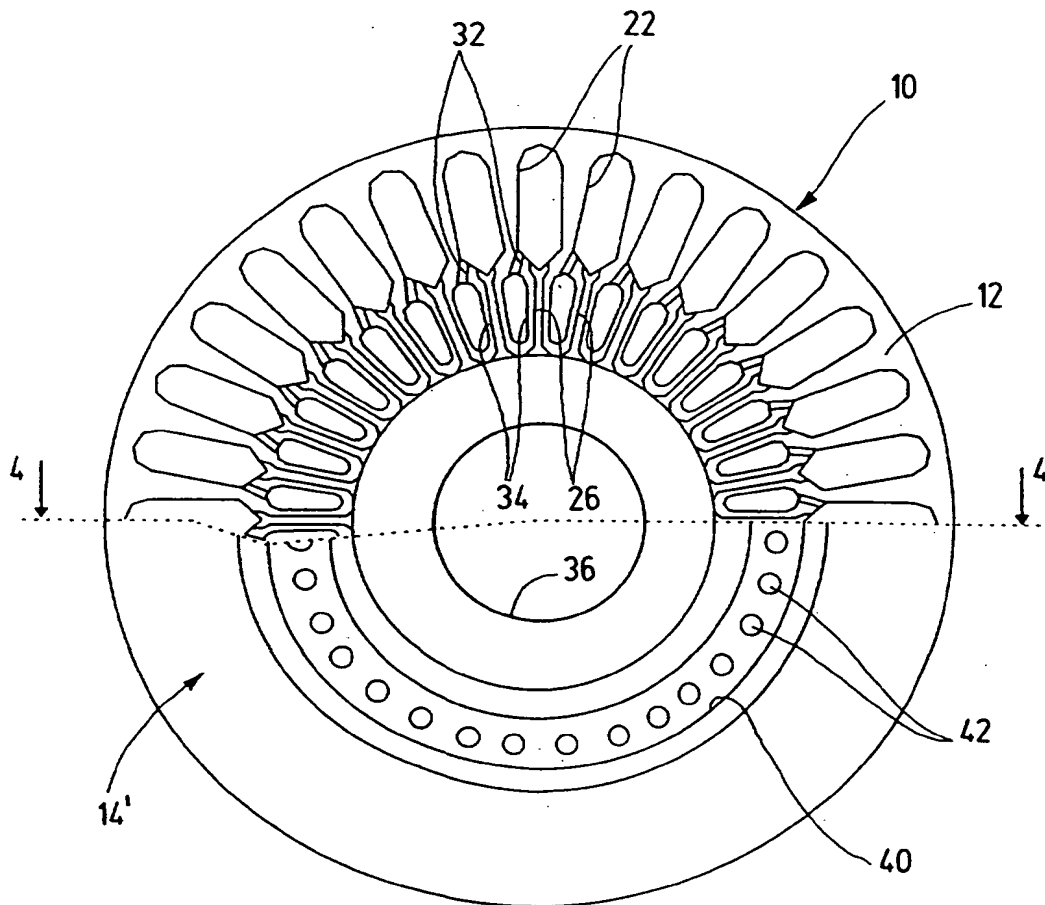


Fig. 3

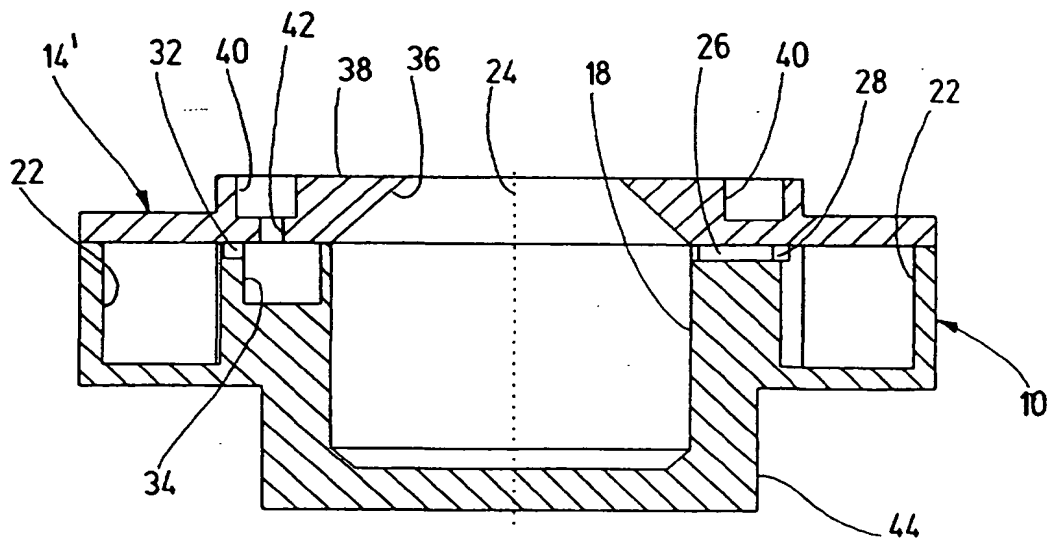


Fig. 4

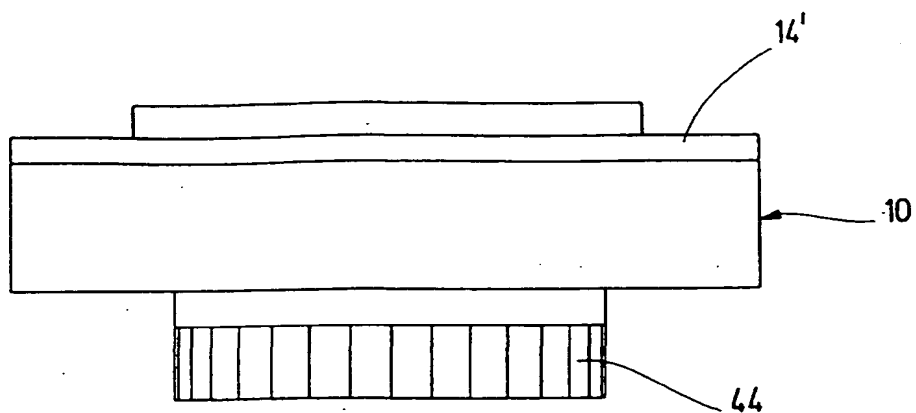


Fig. 5

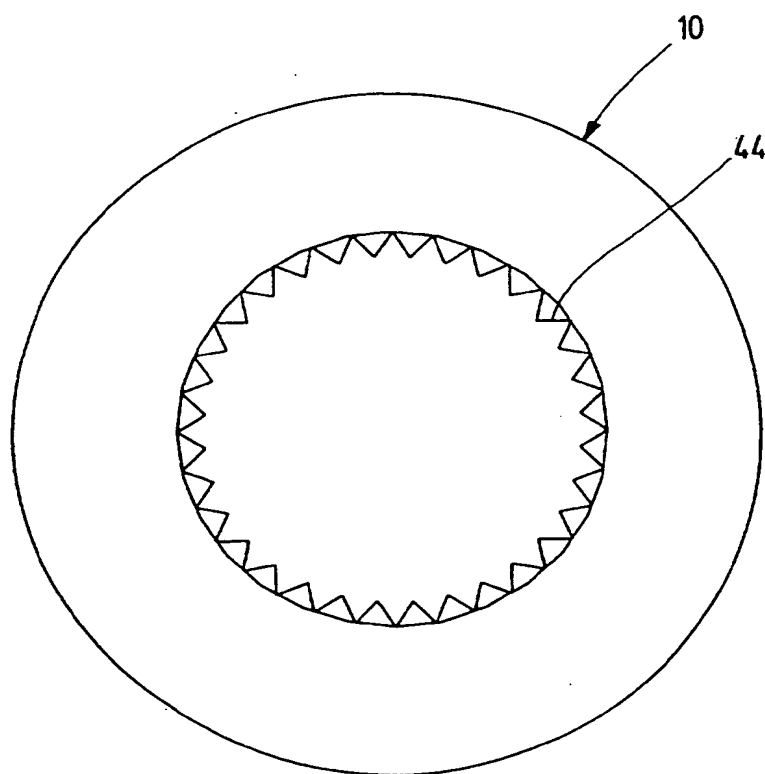
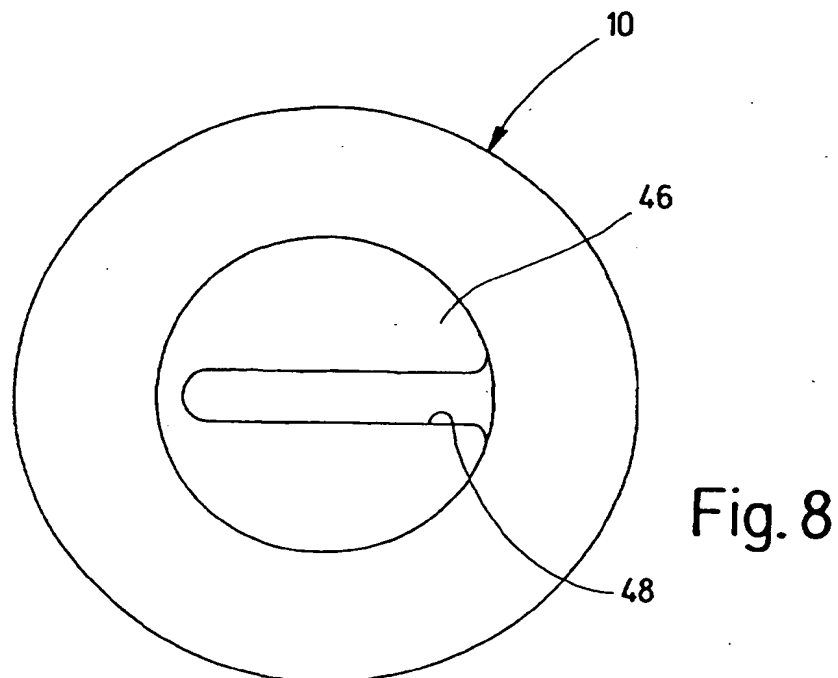
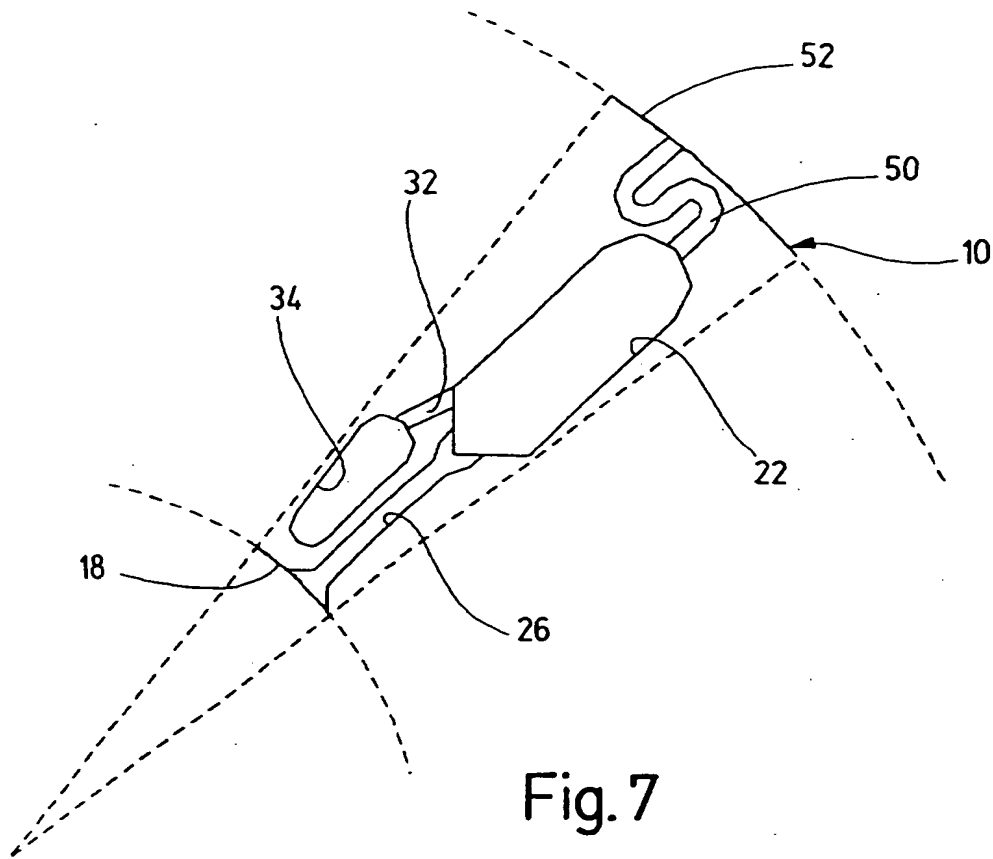
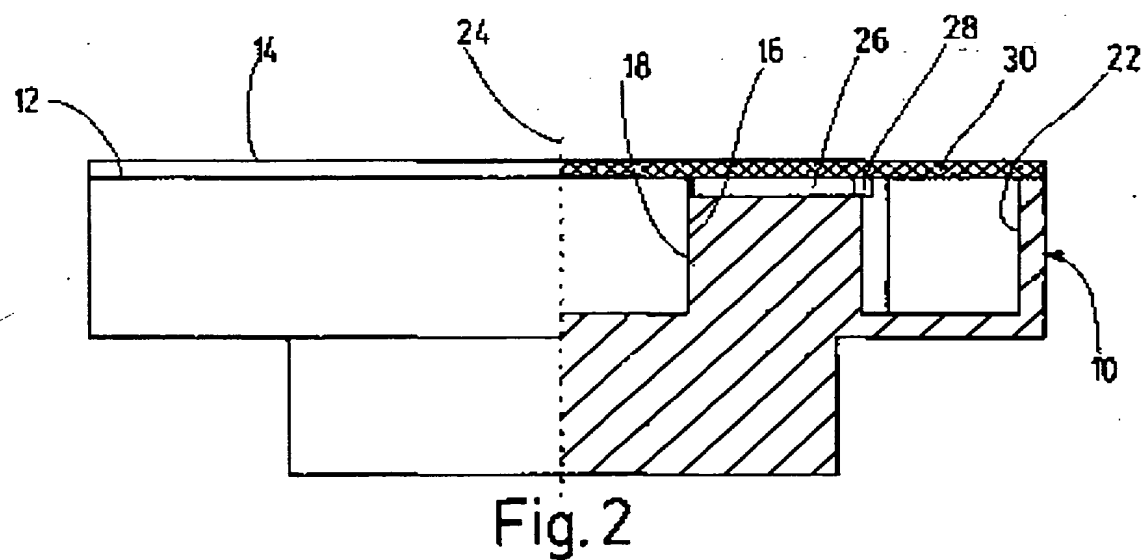
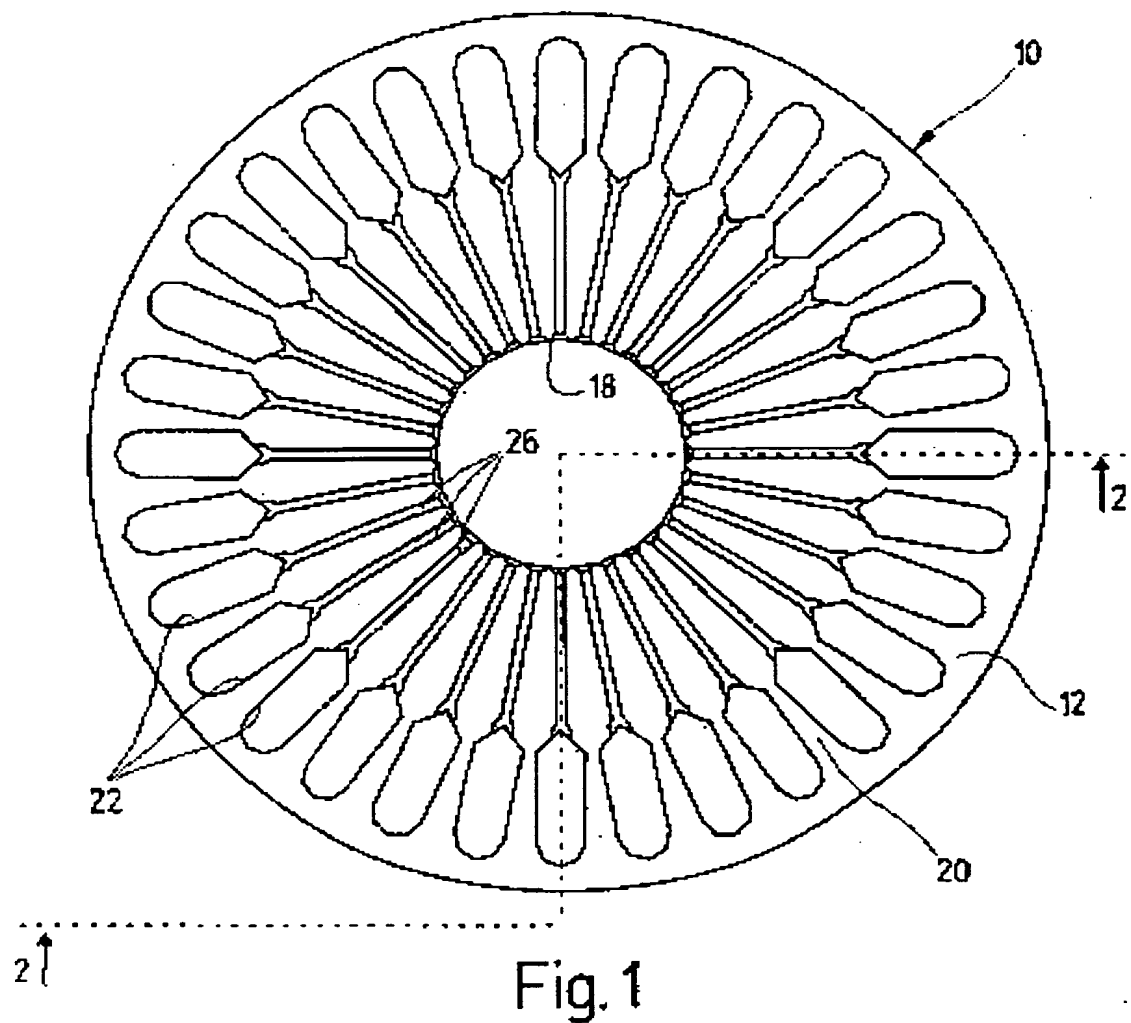


Fig. 6





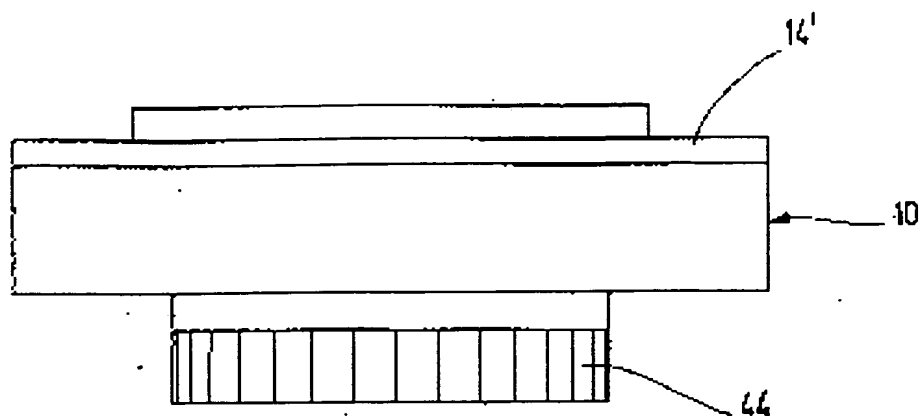


Fig. 5

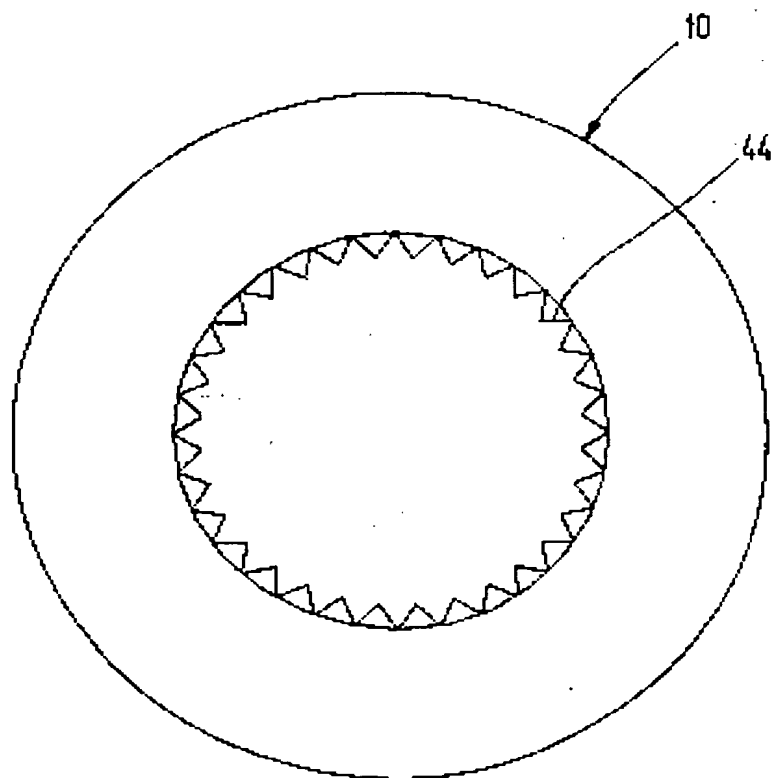


Fig. 6

